

りインフルエンザワクチンがアナフィラキシー発症に関与していたことが示唆された。

最後に、今までの検討から、インフルエンザワクチンに対する IgE 抗体の存在は、インフルエンザワクチンによるアナフィラキシー発症の必要条件であるが、アナフィラキシー発症の十分条件ではない。今後インフルエンザワクチンを含めた各種ワクチンの安全性を図るために、ワクチン後のアナフィラキシー発症の必要十分条件を明らかにする必要がある。さらに、アナフィラキシー例に対する必要な検査、診断基準が明確になれば、ワクチン接種のハイリスク者を予知することができ、リスクに応じた接種が可能になることが期待される。

E. 結論

K社の2PE入りインフルエンザワクチン接種後にアナフィラキシーをきたした症例を対象に、インフルエンザワクチンによるアナフィラキシー発症の病態について検討を行った。アナフィラキシー発症の必要條件は、インフルエンザワクチンに対する高いIgE抗体を保有していることであり、鶏卵アレルギーはインフルエンザワクチンによるアナフィラキシー発症に関与していないことが示された。

F. 研究発表

(著書)

1)庵原俊昭：ワクチン接種事業の総括と今後は？鈴木 宏、渡辺 彰編。インフルエンザの最新知識 Q&A2012～パンデミック H1N12009 の終焉を迎えて～。医薬ジャーナル社、東京、p35-39、2012

(論文)

1)庵原俊昭：インフルエンザワクチン—その特徴と効果。医学のあゆみ 241:95-100, 2012

2) Morioka I, Nonoyama S, Tanaka-Taya K, Ihara T, Sugaya N, Ueda I, Kumagai T, Okada K, Hosoya M, Okabe N, and Morishima T: Survey of Japanese infants younger than 3 months who were treated with oseltamivir for influenza: Safety of oseltamivir treatment. *San J Infect Dis*, 2012; early online: 1-5

3) 渡辺正博、伊藤正寛、庵原俊昭：マルチプレックス PCR を用いた呼吸器感染症ウイルスの検討。日本小児科医会会報 43:175-17, 2012

4) Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T: Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine production. *Vaccine* 30:3885-3890, 2012

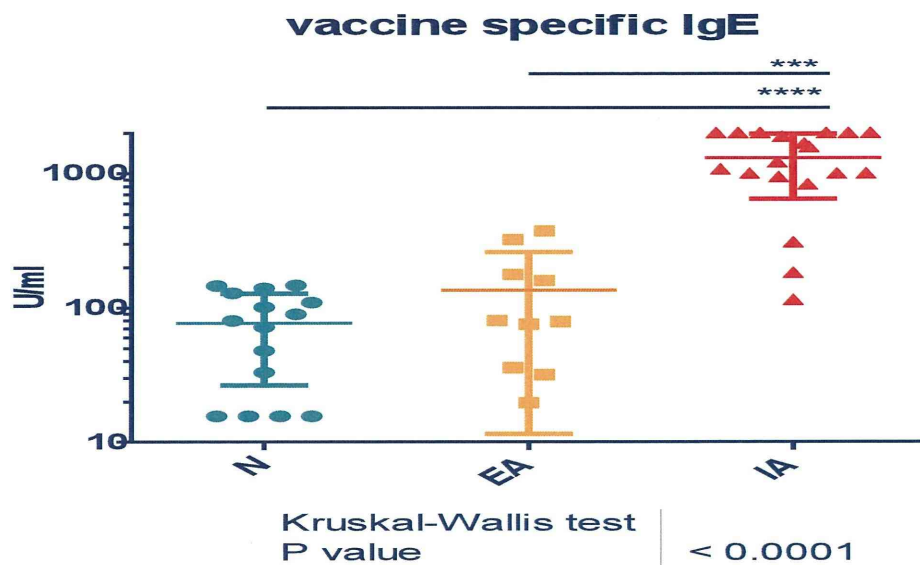
5) 二井立恵、伊佐地真知子、二井 栄、庵原俊昭：妊婦におけるインフルエンザワクチンの免疫原性・安全性。小児科 53:497-503, 2012

6) Ito M, Nukuzuma S, Sugie M, Yoshioka M, Kon-no M, Yasutake H, Umegaki Y, Ishikawa Y, Yano T, Ihara T: Detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus RNA by real-time RT-PCR. *Pediatr Intern* 54:959-962, 2012

(学会発表)

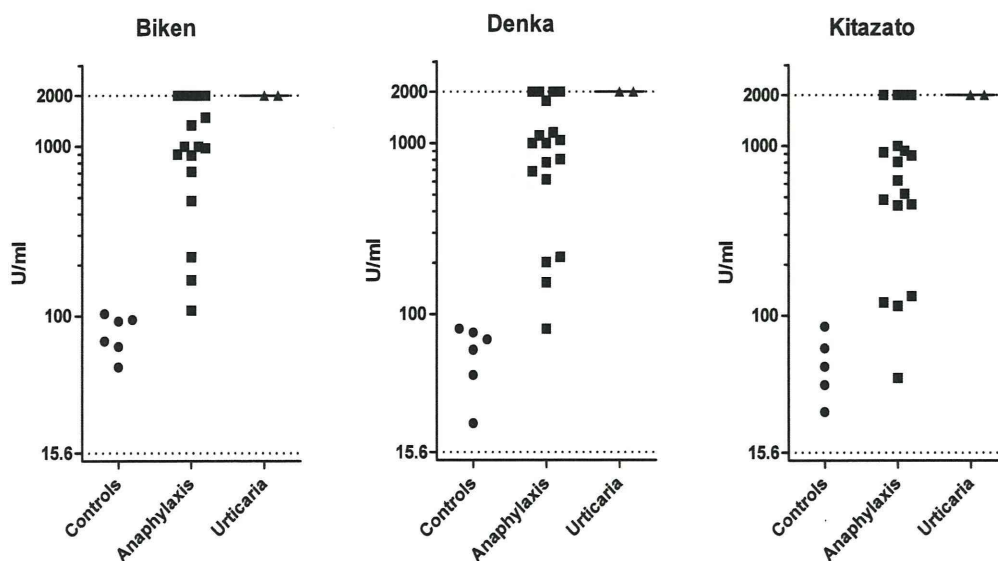
1)落合 仁、高橋裕明、庵原俊昭：三重県亀山市におけるインフルエンザの流行とインフルエンザワクチン有効性の検討～

(図2) 疾患による抗インフルエンザワクチン (K社) IgE 抗体

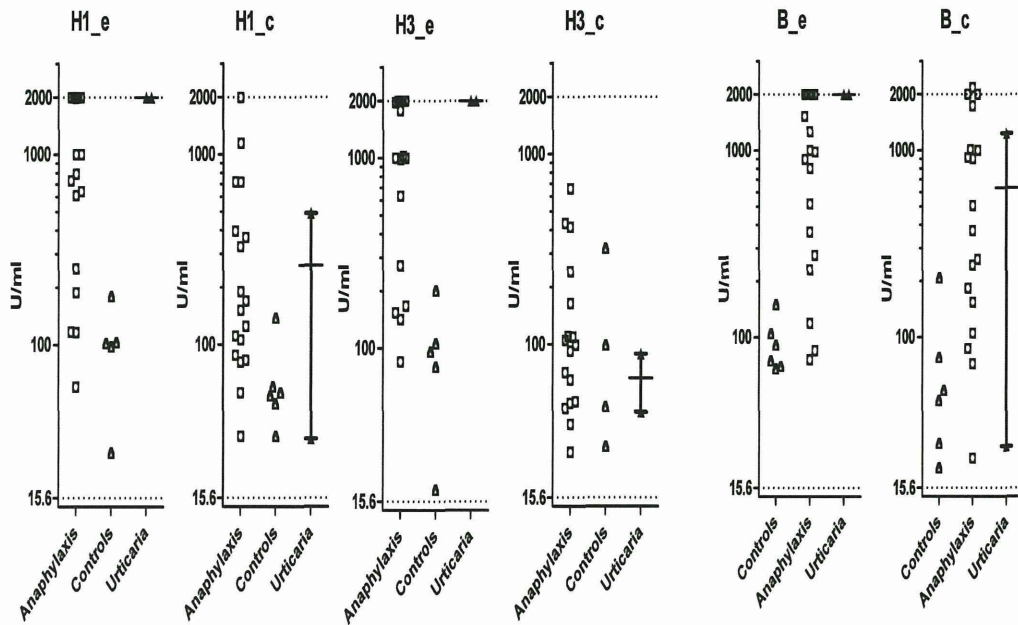


N : インフルエンザワクチンによるアナフィラキシーなし、鶏卵アレルギーなし
 EA : インフルエンザワクチンによるアナフィラキシーなし、鶏卵アレルギーあり
 IA : インフルエンザワクチンによりアナフィラキシー発症

(図3) 各メーカーのインフルエンザワクチンに対する IgE 抗体

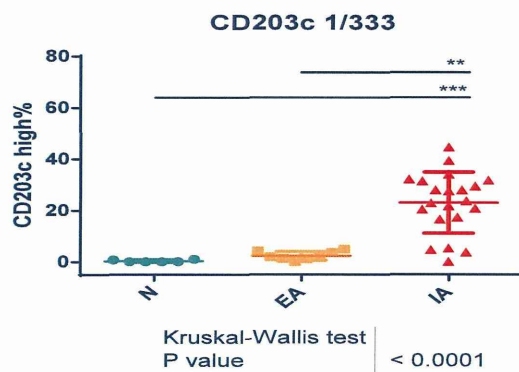


(図4) 発育鶏卵由来および細胞培養由来インフルエンザワクチン各コンポーネントに対するIgE抗体

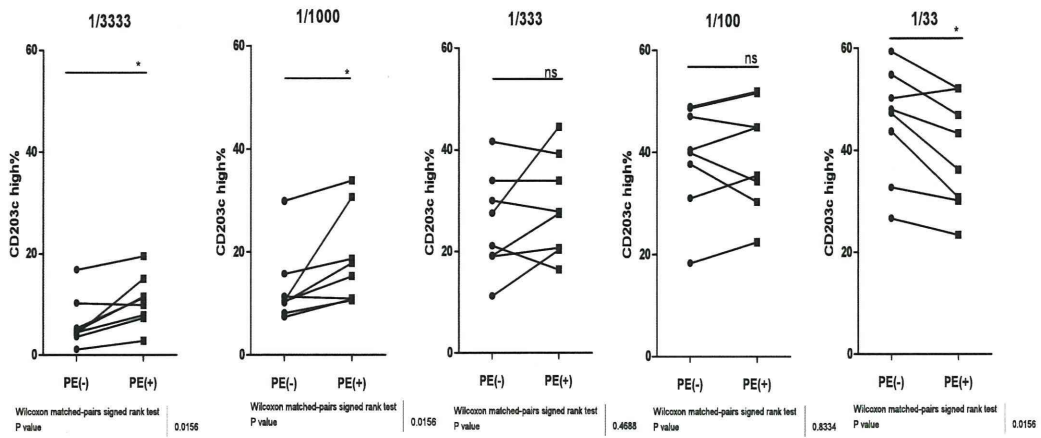


e : 発育鶏卵由来インフルエンザワクチンコンポーネント
 c : 組織培養由来インフルエンザワクチンコンポーネント

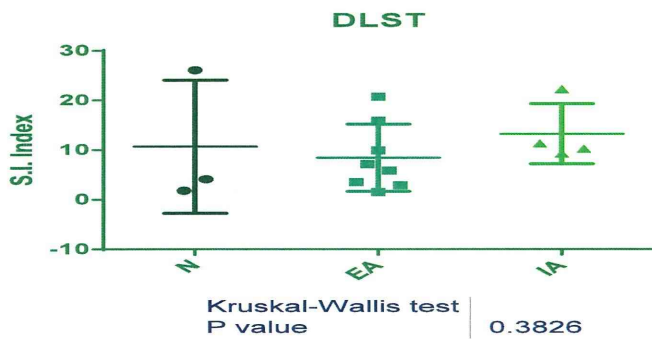
(図5) 好塩基球活性化試験結果



(図6) K社インフルエンザワクチン刺激によるCD203cの発現(2PEありのワクチンとなしのワクチンによる刺激)



(図7) インフルエンザワクチン刺激によるリンパ球活性化試験(DLST)



課題4：ワクチン・アジュバントによる副反応と副作用の分子メカニズム解明と解決方法の模索

課題5：ワクチンの「真」の有用性をヒトの検体を用いた免疫学的方法で検討する臨床研究

沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1株）治験保存血清を使った、microRNAチップ解析臨床研究

(独)医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト 石井健・鉄谷耕平

研究要旨

本研究は故神谷齊国立病院機構三重病院名誉院長を研究代表者とする「沈降新型インフルエンザワクチン（H5N1）保存血清を使った臨床研究」の分担研究として、過去に行われた上記ワクチン臨床治験及びそれに付随する臨床研究において、すでに得られた保存血清を用い、血清中マイクロRNAの解析を行うものである。

2010年12月に独立行政法人医薬基盤研究所倫理審査委員会の承認を得、2010年度および2011年度にそれぞれ15例30検体の解析を行い、複数の興味深いふるまいを示す複数のmiRNAを検索した。2012年度上半期では、これらの計60検体についてバイオインフォマティクス的手法を用い、複数の視点から解析を加えた。2012年度下半期では、解析対象を大幅に拡大し88症例254検体についてmiRNAの解析を行ったところ、ワクチン関連発熱と相関するmiRNAを複数検索することができた。今後バイオインフォマティクス解析手法を様々な適用し、候補miRNAの有用性の検証を進めていきたい。

A. 研究目的

国立感染症研究所より2004年にベトナムで分離されたA/Viet Nam/1194/2004（H5N1）株をリバーシ・ジェネティクスで弱毒したNIBRG-14株の分与を受け、アジュバントとして水酸化アルミニウムゲルを添加した沈降新型インフルエンザワクチン（以下、プレパンデミックワクチン）が国内4社により作製され、非臨床試験及び健康成人に対する臨床試験（以下、成人治験）が実施された。そのうち、学校法人北里研究所及び一般財団法人阪大微生物病研究会のワクチンについては、2007年10月に薬事法上の製造販売承認を取得した。

その後、成人治験成績に対する承認審査で求められた対応として、小児に対する適切な用法及び用量の設定を行うため、学校

法人北里研究所及び一般財団法人阪大微生物病研究会のプレパンデミックワクチンについて6ヵ月以上20歳未満の健康小児に対する免疫原性及び安全性を検討するための臨床試験（以下、小児治験）が実施された。

小児治験の結果、抗体価は成人に匹敵する、あるいはそれ以上の上昇が確認されたが、一方で、約半数の被験者に発熱が観察された。そこで、その発熱の原因を探ること、およびより安全性の高いプレパンデミックワクチンの製造に向けた情報を収集することを目的に、成人治験、成人治験後の抗体価追跡調査及び小児治験で得られ、保存されている血清検体を用いたH5N1血清研究が2010年に開始された。H5N1血清研究には血清サイトカイン濃度の解析などとならび、本研究のマイクロRNAチップ

解析が分担研究として含まれる。

2011 年度までの成果としては、30 症例の、治験薬接種前及び接種後の検体計 60 検体におけるマイクロ RNA チップ解析の粗解析の結果、接種によって変動する miRNA、発熱の有無に相関する miRNA、抗体価上昇の高低に相関する miRNA などを認めていた。これらの機能については未解明であるが、発熱や有効性を接種前に予測できるバイオマーカーとしての可能性が示唆された。

そこで 2012 年度は、小児治験被験者のうちあらたに 88 名を選定し、これらの治験薬接種前・第 2 回接種前及び接種後の 3 検体計 254 検体を用いて、miRNA について定量的 PCR 解析を行って、本研究手法を検証するとともに、昨年度認められた miRNA のふるまいを検証することを目指した。

B. 研究方法

1. 解析手法の拡大

これまで得られている 60 検体における miRNA の発現データをもとに、単一の miRNA あるいは複数の miRNA の組み合わせと発熱との相関、及び接種前・後の発現比と発熱との相関に着目し解析を行った。

2. 解析対象の大幅な拡大

昨年度と同様に、上記治験の被験者のうち①臨床試験参加同意が得られた者または血清検体の利用について倫理審査委員会等の承認および組織の代表者などの許可が得られた者、かつ②血清検体が十分量保存されている者を対象とし、これまでに測定した 30 名とは別に新たに 88 名を選定した。解析は 2010 年度・2011 年度と同様に、血

清からの RNA 抽出およびチップ解析を東レ株式会社がを行い、各 miRNA の発現は global normalization として表現された。Global normalization を各臨床データと照合して研究分担者が解析を行った。

C. 結果

1. 解析手法の拡大

接種前検体における単一 miRNA の探索および複数 miRNA の組み合わせと発熱との相関関係の探索において、有発熱者及び無発熱者の二群間比較で発現差が見られた miRNA のうち、有意差の上位 7 種の miRNA の発現量総和を、発熱の予測バイオマーカーとして利用することを検討した結果、この手法により、大雑把な発熱予測が可能かもしれないと推測された。

次に、接種前及び接種後の miRNA の発現量の比の、2 を呈とする対数 (\log_2 (接種後/接種前)) を指標にして、有発熱者及び無発熱者での比較を行った結果、発熱者をよく区別できる miRNA が複数見つかり、その組み合わせは、5~10 種の miRNA で構成されうることが推測された。

以上の解析手法の拡大は有望な見通しをもたらしたが、標本数が 30 症例と限定された中での推定であり、更なる検討症例の拡大が望まれた。

2. 解析対象の大幅な拡大

研究者の手元にある小児治験被験者由来血清のうち、88 症例を選定し、第 1 回接種前検体・第 2 回接種前検体・第 2 回接種後検体の 3 時点すべての血清合計 254 検体において、miRNA の発現を検討した。1 で述べた単一・複数の miRNA の組み合わせと

発熱との相関関係をまず検討した結果、これまで実施してきた 15 検体あるいは 30 検体で推定されたバイオマーカー候補の miRNA とは異なる miRNA が、バイオマーカー候補として選定された。このことは、15 症例分 30 検体で検討した 2010 年度、追加 15 症例分を合わせて 60 検体で検討した 2011 年度でそれぞれ見出されたバイオマーカー候補 miRNA が、254 検体での検討に耐ええなかったことを意味し、より慎重で総合的な検討が必要であると判断された。

3. 総合的な検討

バイオマーカー候補として選定される miRNA は、いかなる検体群をもとに検討・選定されるかによって大きく異なることが経験された。

本研究は完了した治験で得られた血清検体を対象とする後ろ向き研究であり、現時点で同ワクチンを用いた新たな小児治験の実施が検討されていないことから、本研究成果の厳密な検証行為は現時点で実現不可能である。また一般に検討対象検体数が大きいほど、選定結果に対する信頼度が高まると考えられる。そのため、年度を追って対象検体数を増加させ研究を行ってきたが結論を得るには至っていない。

これらを受けて、まず miRNA 発現量データの表現方法 (global normalization) についての基礎的な検証の必要性について、東レ担当者を交え検討している。また現在までに得られている miRNA 発現のデータを基に、バイオインフォマティクスの 4 グループがそれぞれ独自の観点から解析検討を行っている。1 で行ったブートストラップを併用する welch の t 検定と K 近傍法に

加え、二つの異なる miRNA の比を総当たりで検討する方法、ロジスティック回帰の四手法である。特に発熱との相関の解析においてそれぞれに進捗が見られるが、四手法のうちいずれかの三手法で共通して選定される miRNA は複数存在するものの、四手法すべてにおいて共通して選定される “miRNA consensus” はまだ見出されていない。

D.E. 結論及び考察

(C3を参照)

最大の課題である miRNA consensus を得るべく、データの品質に関する検討および各手法で得られる結果相互の重みづけ・整合性の検討が進行している。ただし本研究が完了した治験由来の検体を用いるという限界からも厳密な検証は極めて困難であり、四手法の比較検討など本研究で行っている検証過程についてまず論文化し、内外の意見を幅広く聴取して miRNA consensus の確立を究極的に目指す方針である。

F. 文献

なし

G. 研究発表

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
庵原俊昭	ワクチン接種事業の総括と今後は？	鈴木 宏、渡辺 彰編	インフルエンザの最新知識 Q&A 2012～パンデミック H1N1 2009の終焉を迎えて～	医薬ジャーナル社	東京	2012	35-39
Tang CK and Ishii KJ	The Impact of Nucleic Acids on Diseases and Vaccinology		Biological DNA Sensor:	Elsevier Inc	アメリカ	2013	In press

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakajima N, Van Tin N, Sato Y, Thach HN, Katano H, Diep PH, Kumasaka T, Thuy NT, Hasegawa H,	Pathological study of archival lung tissues from five fatal cases of avian H5N1 influenza in Vietnam.	Mod Pathol	Nov 23	doi: 10.1038/modpathol.2012.193. [Epub ahead of print]	2012
Sasaki I, Hoshino K, Sugiyama T, Yamazaki C, Yano T, Iizuka A, Hemmi H, Tanaka T, Saito M,	Spi-B is critical for plasmacytoid dendritic cell function and development.	Blood	120(24)	4733-43 doi:10.1182	2012

van Riet E, Ainai A, Suzuki T, Hasegawa H.	Mucosal IgA responses in influenza virus infections; thoughts for vaccine design.	Vaccine	30(40)	5893-900 doi:10.1016	2012
Yanagita H, Yamamoto N, Fuji H, Liu X, Ogata M, Yokota M, Takaku H, Hasegawa H.	Mechanism of Drug Resistance of Hemagglutinin of Influenza Virus and Potent Scaffolds Inhibiting Its Function.	ACS Chem Biol	7(3)	552-62 doi:10.1021	2012
Ainai A, Tamura S, Suzuki T, Ito R, Asanuma H, Tanimoto T, Gomi Y, Manabe S, Ishikawa T.	Characterization of neutralizing antibodies in adults after intranasal vaccination with an inactivated influenza vaccine.	J Med Virol	84(2)	336-44 doi:10.1002	2012
Sakoda, Y. et al.	Purification of human and avian influenza viruses using cellulose sulfate ester (Cellufine Sulfate) in the process of vaccine production.	Microbiol Immunol	Vol.56	p.490-495	2012
Sakoda, Y. et al.	Reintroduction of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus by migratory water birds, causing poultry outbreaks in 2010-2011 winter season in Japan.	J Gen Virol	Vol.93	p.541-550	2012

Nomura, N. et al.	An H9N2 influenza virus vaccine prepared from a non-pathogenic isolate from a migratory duck confers protective immunity in mice against challenge with an H9N2 virus isolated from a girl in Hong Kong.	J Vet Med Sci	Vol.74	p.441-447	2012
Nomura, N. et al.	Characterization of avian influenza viruses isolated from domestic ducks in Vietnam in 2009 and 2010.	Arch Virol	Vol.157	p.247-257	2012
Arikata, M. et al.	Memory Immune Responses against Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus Induced by a Whole Particle Vaccine in Cynomolgus Monkeys Carrying Mafa-A1*052ratio02.	PLoS One	Vol.7	e37220	2012
Okamatsu, M. et al.	Potency of a vaccine prepared from A/swine/Hokkaido/2/1981 (H1N1) against A/Narita/1/2009 (H1N1) pandemic influenza virus strain.	Virol J	Vol.10	p.47	2012
Shichinohe, S. et al.	Potency of an inactivated influenza vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 virus against a challenge with antigenically drifted highly pathogenic avian influenza viruses in chickens.	Vet Microbiol	in press		2012

Sawada A, Yamaji Y, <u>Nakayama T.</u>	Mumps Hoshino and Torii vaccine strains were distinguished from circulating wild strains.	J Infect Chem other	DOI 10.1007/s10156-012-0515-3		2012
Matsubara K, Iwata S, <u>Nakayama T.</u>	Antibodies against mumps virus component proteins.	J Infect Chem other	18		2012
<u>Nakayama T</u> , Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T.	Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children.	Vaccine	30	7662-7666	2012
<u>Nakayama T</u> , Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T	Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions.	Vaccine	30,	3885-3890	2012
庵原俊昭	インフルエンザワクチン—その特徴と効果—	医学のあゆみ	241	95-100	2012
Morioka I, Nonoyama S, Tanaka-Taya K, <u>Ihara T</u> , Sugaya N, Ueda I, Kumagai T, Okada K, Hosoya M, Okabe N, and Morishima T	Survey of Japanese infants younger than 3 months who were treated with oseltamivir for influenza	Safety of oseltamivir treatment. San J Infect Dis	early online	1-5	2012
渡辺正博、伊藤正寛、 <u>庵原俊昭</u>	マルチプレックスPCRを用いた呼吸器感染症ウイルスの検討	日本小児科医学会報	43	175-17	2012

Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, <u>Ihara T</u>	Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine production	Vaccine	30	3885-3890	2012
二井立恵、伊佐地真知子、二井 栄、 <u>庵原俊昭</u>	妊婦におけるインフルエンザワクチンの免疫原性・安全性	小児科	53	497-503	2012
Ito M, Nukuzuma S, Sugie M, Yoshioka M, Kon-no M, Yasutake H, Umegaki Y, <u>Ishikawa Y</u> , Yano T, <u>Ihara T</u>	Detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus RNA by real-time RT-PCR	Pediatr Intern	54	959-962	2012

Kim DY, Fukuyama S, Nagatake T, Takamura K, Kong IG, Yokota Y, Lee CH, Kiyono H.	Implications of nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) in the development of allergic responses in an allergic rhinitis mouse model.	Allergy	67(4)	502-9	2012
Takagi S, Saito Y, Hijikata A, Tanaka S, Watanabe T, Hasegawa T, Mochizuki S, Kunisawa J, Kiyono H, Koseki H, Ohara O, Saito T, Taniguchi S, Shultz LD, Ishikawa F.	Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation.	Blood	119(12)	2768-77	2012
Kunisawa J, Hashimoto E, <u>Ishikawa I</u> , Kiyono H.	A pivotal role of vitamin B9 in the maintenance of regulatory T cells in vitro and in vivo.	PLoS One	7(2)	e32094	2012
Fukuyama Y, Tokuhara D, Kataoka K, Gilbert RS, McGhee JR, Yuki Y, Kiyono H, <u>Fujihashi K</u> .	Novel vaccine development strategies for inducing mucosal immunity.	Expert Rev. Vaccines	11(3)	367-79	2012

Sato S, Kiyono H.	The mucosal immune system of the respiratory tract.	Curr. Opin. Virol.	2(3)	225-32	2012
Yuki Y, Mejima M, Kurokawa S, Hiroiwa T, Kong IG, Kuroda M, Takahashi Y, Nochi T, Tokuhara D, Kohda T, Kozaki S, Kiyono H.	RNAi suppression of rice endogenous storage proteins enhances the production of rice-based Botulinum neurotoxin type A vaccine.	Vaccine	30(28)	4160-6	2012
Kunisawa J, Kiyono H.	Alcaligenes is Commensal Bacteria Habituating in the Gut-Associated Lymphoid Tissue for the Regulation of Intestinal IgA Responses.	Front. Immunol.	3	65	2012
Tanaka S, Saito Y, Kunisawa J, Kurashima Y, Wake T, Suzuki N, Shultz LD, Kiyono H, Ishikawa F.	Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL2ryKO mice.	J. Immunol.	188(12)	6145-55	2012
Kunisawa J, Kiyono H.	Immunological function of sphingosine 1-phosphate in the intestine.	Nutrients	4(3)	154-66	2012
Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, Shibata N, Grunberg S, Sinha R, Zahm AM, Tardif MR, Sathaliyawala T, Kubota M, Farber DL, Collman RG, Shaked A, Fouser LA, Weiner DB, Tessier PA, Friedman JR, Kiyono H, Bushman FD, Chang KM, Artis D.	Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria.	Science	336 (6086)	1321-5	2012
Jeon SG, Kayama H, Ueda Y, Takahashi T, Asahara T, Tsuji H, Tsuji NM, Kiyono H, Ma JS, Kusu T, Okumura R, Hara H, Yoshida H, Yamamoto M, Nomoto K, Takeda K.	Probiotic Bifidobacterium breve induces IL-10-producing Tr1 cells in the colon.	PLoS Pathog.	8(5)	e1002714	2012

Shibata T, Takemura N, Motoi Y, Goto Y, Karuppuchamy T, Izawa K, Li X, Akashi-Takamura S, Tanimura N, Kunisawa J, Kiyono H, Akira S, Kitamura T, Kitaura J, Uematsu S, Miyake K.	PRAT4A-dependent expression of cell surface TLR5 on neutrophils, classical monocytes and dendritic cells.	Int. Immunol.	24(10)	613-23	2012
Kinoshita M, Kayama H, Kusano T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, Sakaguchi S, Takada K.	Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon.	J. Immunol.	189(6)	2869-78	2012
Kunisawa J, Kiyono H.	Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine.	Drug Discov. Today	18(1-2)	87-92	2012
Kumagai T, Kiyono H.	Summary for symposium I on the development of a more efficacious influenza vaccine held at the 15th Annual Meeting of the Japanese Society for Vaccinology, Tokyo, 2011.	Vaccine	30(44)	6338-9	2012
Kurashima Y, Amiya T, Nochi T, Fujisawa K, Haraguchi T, Iba H, Tsutsui H, Sato S, Nakajima S, Iijima H, Kubo M, Kunisawa J, Kiyono H.	Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors.	Nat. Commun.	3(1034) doi: 10.1038	ncomms2023	2012
Nakajima-Adachi H, Koike E, Totsuka M, Hiraide E, Wakatsuki Y, Kiyono H, Hachimura S.	Two distinct epitopes on the ovalbumin 323-339 peptide differentiating CD4 T cells into the Th2 or Th1 phenotype.	Biosci. Biotechnol. Biochem.	76(10)	1979-81	2012
Sato S, Kaneto S, Shibata N, Takahashi Y, Okura H, Yuki Y, Kunisawa J, Kiyono H.	Transcription factor Spi-B-dependent and -independent pathways for the development of Peyer's patch M cells.	Mucosal Immunol.	doi: 10.1038	mi.2012.122	2012

Kusu T, Kayama H, Kinoshita M, Jeon SG, Ueda Y, Goto Y, Okumura R, Saiga H, Kurakawa T, Ikeda K, Maeda Y, Nishimura J, Arima Y, Atarashi K, Honda K, Murakami M, Kunisawa J, Kiyono H, Okumura M, Yamamoto M, Takeda K.	Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7 controls Th17 cell responses through regulation of luminal ATP in the small intestine.	J. Immunol.	190(2)	774-83	2013
Kong IG, Sato A, Yuki Y, Nochi T, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kurokawa S, Okada K, Sato S, Briles D, Kunisawa J, Inoue Y, Yamamoto M, Akiyoshi K, and Kiyono H.	Nanogel-based PspA intranasal vaccine prevents invasive disease and nasal colonization by Pneumococcus.	Infect. Immun.	In press		2013
Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, <u>Ishii KJ</u> , Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T.	A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis.	J Allergy Clin Immunol.	130(1):	184-94. e11	2012
Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, <u>Ishii KJ</u> , Ihara T.	Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions.	Vaccine.	6;30(26)	3885-90.	2012
Desmet CJ, <u>Ishii KJ</u> .	Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination.	Nat Rev Immunol.	22;12(7)	479-91	2012
Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, Sakurai F, Kawabata K, <u>Ishii KJ</u> , Akira S, Mizuguchi H.	Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, Sakurai F, Kawabata K, <u>Ishii KJ</u> , Akira S, Mizuguchi H.	Biochem Biophys Res Commun.	17;425(1)	89-93	2012
<u>Tetsutani K</u> , <u>Ishii KJ</u> .	Adjuvants in influenza vaccines.	Vaccine			2012

Nakayama T, Kumagai T, <u>Ishii KJ</u> , Ihara T.	Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children.	Vaccine.			2012
Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, <u>Aoshi T</u> , Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, <u>Ishii KJ</u> , Coban C.	Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism.	Cell Host Microbe.	15:12 (5)	705-16	2012
<u>Jounai N</u> , <u>Kobiyama K</u> , <u>Takeshita F</u> , <u>Ishii KJ</u> .	Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination.	Front Cell Infect Microbiol.	2 (168)	1-13	2012
Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, <u>Aoshi T</u> , <u>Ishii KJ</u> , Yokoyama M.	Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon.	J Control Release.	10:165 (3)	183-90.	2013
Tougan T, <u>Aoshi T</u> , Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, <u>Ishii KJ</u> , Horii T.	TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models.	Hum Vaccin Immunother.	4:9 (2)	1-8	2013
Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, <u>Ishii KJ</u> , Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T.	DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking.	Proc Natl Acad Sci U S A	110(8)	2969-74	2013
Kuroda E, Coban C, Ishii KJ	Particulate adjuvant and innate immunity: past achievements, present findings and future prospects.	Int. Rev. Immunol.	In press		2013

<u>Tang CK</u> , <u>Aoshi T</u> , <u>Jounai N</u> , <u>Ito J</u> , <u>Ohata K</u> , <u>Kobiyama</u> , <u>K</u> , <u>Dessailly BH</u> , <u>Kuroda E</u> , <u>A</u> <u>kira S</u> , <u>Mizuguchi K</u> , <u>Coban</u> <u>C</u> and <u>Ishii KJ</u>	The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant	PLOS one	In pres s		2013
<u>石井 健</u> .	「宿主の生体バリア・腸管、肺、皮膚における新たな免疫細胞とその機能。」	実験医学増刊	vol.30 No.20	p134(329 2)-137(329 5).	2012
<u>石井 健</u>	「感染・共生・生体防御研究から生まれる新たな疾患予防、治療ターゲット。」	実験医学増刊	vol.30 No.20	p172(333 0)-175(333 3)	2012
<u>黒田悦史</u> .	「粒子アジュバントのメカニズム。」	実験医学増刊	vol.30 No.20	p203(336 1)-208(336 6)	2012
<u>城内 直</u> 、 <u>石井 健</u>	「細胞外核酸の生物学的意義と臨床応用。」	実験医学増刊	vol.30 No.20	p209(336 7)-216(337 4).	2012
<u>小檜山康司</u> 、 <u>石井 健</u>	「自然免疫メカニズムを利用するワクチンアジュバント開発。」	THE LUNG	20(4)	54-61	2012
<u>鉄谷耕平</u> 、 <u>石井 健</u> .	「アジュバント開発研究の新展開：自然免疫から審査行政。」	ファームテク ジャパン	28(4)	45-52	2012
<u>鉄谷耕平</u> 、 <u>石井 健</u> .	「ワクチンアジュバントの現状と展望。」	レギュラトリ ーサイエンス 学会誌	2(2)	149-158	2012
<u>石井 健</u> .	「トップランナーに聞く 核酸による自然免疫および獲得免疫の制御機構の研究と核酸アジュバントのワクチンへの応用研究」	最新医学	68(2)	107-111	2013
<u>大西 元康</u> 、 <u>石井 健</u>	「ワクチン（アジュバント）デザインの最新展開」	医薬ジャーナル	49(2)	699-705	2013
<u>城内 直</u> 、 <u>石井 健</u> .	「感染と免疫」	Medicina	50(3)	406-411	2013



Review

Adjuvants in influenza vaccines

Kohhei Tetsutani, Ken J. Ishii*

Laboratory of Adjuvant Innovation, National Institute of Biomedical Innovation, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 September 2012

Accepted 7 September 2012

Available online 19 October 2012

Keywords:

Vaccine adjuvant

Influenza vaccine

ABSTRACT

The effectiveness of influenza vaccines is still controversial, and the role of adjuvants in such vaccines is briefly reviewed in this paper. Inactivated whole virus vaccines may include components that function as adjuvants, meaning that additive adjuvants are often not required. MF59 and AS03 showed higher adjuvanticity than aluminum salts in several clinical studies. Recent research has suggested that immune cell recruitment is the main mechanism underlying adjuvant actions in general, and that aluminum salts induce this recruitment via inflammation at the injected site. The aspect of how oil-based adjuvants, such as MF59 and AS03, recruit immune cells remains to be clarified.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	7658
2. Clinical experiences of influenza vaccines: effects of adjuvants	7658
3. Whole virion vaccines: vaccines with “unintended adjuvant”?	7659
4. Mechanisms of influenza vaccine adjuvants	7659
5. Concluding remarks	7660
Conflicts of interest	7660
References	7660

1. Introduction

Influenza vaccines have been proven to induce high immunity in various trials. However, the coverage of seasonal influenza vaccine remains around half in Europe, America, and Asia [1], that may partially because its social usefulness is not yet fully shared in the population.

Vaccine effectiveness consists of vaccine immunogenicity, safety, and cost, and these aspects should be reviewed for assessment of influenza vaccines. In particular, vaccine adjuvants, vaccine administration routes, and/or immunization schedules may be the keys to improve vaccine efficacy and safety.

An adjuvant is used to enhance vaccine immunogenicity per se. The adjuvant effect, or adjuvanticity, would be measured by the ratio of immunogenicity (increase in geometric mean of antibody titer, percent responders, or seroconversion rate) of vaccine-with-adjuvant to vaccine-without-adjuvant in either non-clinical or clinical conditions. Recent clinical studies have suggested that AS03 or MF59 shows good adjuvanticity in influenza vaccines, but

these adjuvants also increase local and systemic adverse reactions, although they are not severe.

Recently developed alternative vaccination routes such as nasal, skin patch or oral route vaccines often show better efficiency than classical administration. Several nasal vaccines (influenza [3], measles [4]), microneedle skin patch vaccines [5,6], oral vaccines (rotavirus vaccine [7]) are well studied.

Boosting immunization is promising for improving protection. Even when the priming is not sufficiently immunogenic, sequential immunization has been shown to provide enough protection.

In this review, adjuvants for influenza vaccines are briefly overviewed and the current knowledge of their functions based on molecular biology is reviewed.

2. Clinical experiences of influenza vaccines: effects of adjuvants

The World Health Organization's list of influenza vaccine developments [8] includes several studies analyzing the immunogenicity and safety profiles of adjuvanted vaccines versus non-adjuvanted vaccines (Table 1). Aluminum salts, the most world-wide and historically used adjuvants, were mostly used in the listed studies, followed by MF59® from Novartis and AS03 from GlaxoSmithKline.

* Corresponding author.

E-mail address: kenishii@biken.osaka-u.ac.jp (K.J. Ishii).

Table 1
Profiles of reviewed clinical studies that compared vaccines with and without adjuvants (numbers indicate references).

Vaccine type		Adjuvant			
		Aluminum	AS03	MF59	Others ^a
Pandemic	Whole virion	9, 21, 22	Nil	Nil	Nil
	Subunit/split	12–15	10, 11, 22	16–19	20, 24
	Recombinant	23	Nil	Nil	Nil
Seasonal	Subunit	Nil	Nil	25–27	Nil

^a One study used Matrix M™ [20] and the other used Inulin [24].

Immunogenicity was reviewed by the increase in geometric mean of the antibody titer (GMT), vaccinee ratio of seropositivity, and ratio of seroconversion. The antibody titer was measured by either hemagglutinin inhibition assays or microneutralizing assays. The safety profile was reviewed as the frequency of vaccine-related adverse reactions, comprising local reactions of pain, induration, erythema, etc., and systemic reactions of fever, malaise, headache, etc. Since the trial designs differed, especially in doses, schedules, subject backgrounds, and details of the definitions of immunogenicity, inter-trial comparisons were not reasonable, but the authors gained the impression that adjuvanted vaccines caused more frequent adverse reactions, regardless of the adjuvant used. The severity of the adverse events was slight or moderate, and no serious adverse events were reported, indicating that these influenza vaccines adjuvanted with aluminum salts, MF59 or AS03 are tolerable.

Seven studies on aluminum adjuvanted vaccines included various types of whole virion vaccines [9,21,22], subunit/split vaccines [12–15] and recombinant vaccines [23]. They satisfied the European Medical Agency's criteria for assessment of influenza vaccine [28,29], no matter which type of vaccine were used. For example in the two doses whole-virus H5N1 vaccine study, GMT increase on 21 days after the second administration was between 2.7 and 5.2 when Aluminum adjuvant was added, and was between 3.2 and 5.9 without adjuvant [9].

On the other hand, compared with studies on vaccine with other adjuvants (AS03 [10,11,22], MF59 [16–19,25–27] and others [20,24]) the trends for the adjuvant effects on the vaccine immunogenicity differed among the adjuvants, in that aluminum showed lower adjuvanticity than MF59, AS03, or other adjuvants, irrespective of the dose of aluminum (300–1000 µg/dose) or the form of aluminum (hydroxide or phosphate). One study with two doses split vaccine (7.5 µg HA per dose) adjuvanted with MF59 showed 406.9 of GMT on 21 days after the second administration, while non-adjuvanted vaccine showed 156.6 [19]. Higher adjuvanticity of MF59 than aluminum salts has also been shown in a trial on hepatitis B virus vaccines [30], etc.

The protective efficacy of influenza vaccines is mostly assessed by the clinical occurrence of confirmed influenza or influenza-like illness. Direct comparisons between MF59 adjuvanted and non-adjuvanted trivalent influenza vaccines showed that adjuvanted vaccines exhibited higher effectiveness in both young children in Canada [27] and elderly people in Italy [31]. In the former study where influenza illness was confirmed by means of real-time polymerase-chain-reaction in nasopharyngeal aspirates or swabs, the effectiveness of the adjuvanted vaccine was shown by decreased influenza occurrence by 75%; 13 cases among 1937 adjuvanted vaccine group presented influenza illness whereas 50 cases of 1772 non-adjuvanted vaccine group showed influenza illness [27]. In the latter study in elderly people, the protective efficacy of the adjuvanted vaccine appeared to be less, since the odds ratio for developing influenza-like illness with the non-adjuvanted vaccine (versus adjuvanted vaccine) was 1.52, while the odds ratio for non-vaccinated people (versus vaccinated) was 2.16 [31].

From these experiences, it can be said that adjuvants in subunit influenza vaccines enhance the immunogenicity except for aluminum salts, but their adjuvanticity may need more improvement to prevent clinical influenza illness sufficiently.

3. Whole virion vaccines: vaccines with “unintended adjuvant”?

While subunit/split vaccines contain virus surface proteins as the vaccine antigens, whole virion vaccines are made of whole influenza virus particles that have been inactivated, typically by formaldehyde treatment. Therefore, these vaccines are composed of not only surface proteins, such as neuraminidase and hemagglutinin (for type A and type B, as the most commonly used vaccine antigens) or hemagglutinin esterase (for type C), but also matrix proteins and genomic RNA.

A review of three whole virion vaccines suggested that they were effective even though they were without aluminum adjuvants, and one of them was more effective than the aluminum-adjuvanted whole virion vaccine [9]. Superior immunogenicity of a whole virion influenza vaccine has been demonstrated in several Toll-like receptor (TLR) 7-knockout mouse experiments, which suggested it was dependent on TLR7 signaling [32,33]. Sialo-sugar chains of host bind to influenza viruses but TLR7 specifically recognizes RNA of pathogens. These studies suggest that remaining RNA of influenza virus in the whole virion vaccine might unintentionally function as an adjuvant through TLR7 signaling. It is an interesting concept that a whole virion vaccine product might contain a “built-in adjuvant” when we call aluminum salts, MF59, or AS03 are artificially added as adjuvants. However, its generalization to other single-stranded RNA virus vaccines is controversial, since TLR7 and TLR8 polymorphisms did not affect the measles vaccine antibody response [34] and a transcriptional analysis of human blood cells found similar results for a vaccine against yellow fever and poly ICLC, the specific ligand of TLR3 [35].

4. Mechanisms of influenza vaccine adjuvants

The differences in the mechanisms of aluminum and other adjuvants are not yet fully understood, but they are commonly known to induce mild inflammation with immune cell recruitment at the injection site and not to induce Th1 cellular immunity.

Aluminum salts are generally thought to catch antigens and keep them at the local injection site for periods of days to weeks, such that the antigen is slowly presented and processed by the immune system. This “depot effect” was shown historically in diphtheria toxin experiments, in which immunity was impaired when the injection site was removed, while animals with transplantation of the injection site showed transferred immunity in parallel [2]. In addition, inflammation and cell damage caused by aluminum salts were recently shown to be a critical step in their Th2-biased adjuvanticity.

MF59 is still known to be effective when it is administered in advance of a vaccine antigen. However, when MF59 is administered